



# HOKKAIDO UNIVERSITY

|                     |                                                                                                 |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title               | 胆道癌におけるCD73発現とその進行・予後との関連性，及びその生物学的背景メカニズムに関する研究                                                |
| Author(s)           | 白鳥，翔也                                                                                           |
| Degree Grantor      | 北海道大学                                                                                           |
| Degree Name         | 博士(医学)                                                                                          |
| Dissertation Number | 甲第17029号                                                                                        |
| Issue Date          | 2026-06-30                                                                                      |
| DOI                 | <a href="https://doi.org/10.14943/doctoral.k17029">https://doi.org/10.14943/doctoral.k17029</a> |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/100082">https://hdl.handle.net/2115/100082</a>             |
| Type                | doctoral thesis                                                                                 |
| File Information    | SHIRATORI_Shoya.pdf, 全文                                                                         |



# 学 位 論 文

胆道癌における CD73 発現とその進行・予後との関連性,  
及びその生物学的背景メカニズムに関する研究

(Study on the relationship between CD73 Expression  
and progression/prognosis in biliary tract cancer,  
and its underlying biological mechanisms)

2026 年 6 月

北 海 道 大 学

白鳥 翔也



# 学 位 論 文

胆道癌における CD73 発現とその進行・予後との関連性,

及びその生物学的背景メカニズムに関する研究

(Study on the relationship between CD73 Expression

and progression/prognosis in biliary tract cancer,

and its underlying biological mechanisms)

2026 年 6 月

北 海 道 大 学

白鳥 翔也

## 目 次

|                           |      |
|---------------------------|------|
| 発表論文目録および学会発表目録 . . . . . | 1 頁  |
| 要旨 . . . . .              | 2 頁  |
| 略語表 . . . . .             | 5 頁  |
| 緒言 . . . . .              | 6 頁  |
| 方法 . . . . .              | 8 頁  |
| 結果 . . . . .              | 14 頁 |
| 考察 . . . . .              | 27 頁 |
| 結論 . . . . .              | 30 頁 |
| 謝辞 . . . . .              | 31 頁 |
| 利益相反 . . . . .            | 32 頁 |
| 引用文献 . . . . .            | 33 頁 |

## 発表論文目録および学会発表目録

本研究は以下の論文に発表した。

Shoya Shiratori, Kazumichi Kawakubo, Kanako C Hatanaka, Takuma Kobayashi, Teppei Konishi, Yoshiki Shinomiya, Soichiro Oda, Shunichiro Nozawa, Hiroki Yonemura, Ryo Sugiura, Kazuaki Harada, Yoshitsugu Nakanishi, Takehiro Noji, Shinya Tanaka, Satoshi Hirano, Masaki Kuwatani, Yutaka Hatanaka and Naoya Sakamoto. High CD73 expression is associated with poor prognosis in biliary tract cancer through reduced stromal tumor-infiltrating lymphocytes. *Cancers*. 2026; 18(6): 975.

本研究の一部は以下の学会に発表した。

・白鳥 翔也, 川久保 和道, 畑中 佳奈子, 栗谷 将城, 小田 総一郎, 野澤 俊一郎, 米村 洋輝, 杉浦 諒, 畑中 豊, 坂本 直哉  
第34回日本消化器関連学会週間 (JDDW), 2025年10月30日-11月2日, 神戸

## 要旨

### 【背景と目的】

胆道癌 (Biliary tract cancer: BTC) は、治療選択肢が限られ、予後不良な悪性腫瘍である。CD73 は、アデノシン一リン酸 (AMP) をアデノシンに変換する膜結合型エクトヌクレオチダーゼであり、低酸素環境下において発現が亢進する。いくつかの癌種の腫瘍微小環境 (tumor microenvironment: TME) では、CD73 を介したアデノシンが免疫寛容や腫瘍進展を促進することが知られている。しかし、BTC における CD73 の臨床的意義や腫瘍浸潤リンパ球 (tumor-infiltrating lymphocytes: TIL) との関連については十分に明らかにされていない。本研究では、BTC における CD73 発現と免疫学的特徴、臨床転帰との関連を検討することを目的とした。

### 【対象と方法】

本研究は、2018 年 1 月から 2023 年 2 月までに北海道大学病院で外科的根治切除を施行された胆道癌 (BTC) 患者 100 例を対象とした単施設・後ろ向きコホート研究である。対象は 18 歳以上の病理学的に診断された BTC 症例であり、オプアウトの意思を示さなかった患者を含めた。臨床情報として、年齢、性別、臨床背景、既往歴、治療経過、病理学的所見などを収集した。

手術検体からホルマリン固定パラフィン包埋標本 (FFPE) を作製し、5  $\mu$ m 厚に薄切した。最も腫瘍成分が豊富なブロックを選択し、ヘマトキシリン・エオジン (H&E) 染色および免疫染色 (IHC) を実施した。IHC では、CD73, CD3, CD8, Foxp3, CD163 に対する抗体を用い、それぞれ成熟 T リンパ球、細胞傷害性 T 細胞 (CTL)、制御性 T 細胞 (Treg)、および M2 マクロファージを同定した。発色は HRP 標識ポリマー法により行った。

画像解析には人工知能 (artificial intelligence: AI) を用いた解析ソフトウェア DeepPathFinder™ を使用した。H&E 染色スライドをバーチャルスライド化し、腫瘍細胞の最深部を含む領域を tumor bed として定義した。この領域を TME の代表領域とし、DeepPathFinder™ により腫瘍上皮部と間質部を自動識別したうえで、CD73 発現および浸潤リンパ球の面積を定量化した。また、IHC 画像と H&E 染色画像を重ね合わせ、腫瘍部と間質部それぞれにおける免疫細胞マーカーの分布を面積として算出した。腫瘍および間質における単位面積あたりの CD73 陽性面積を算出し、それぞれ T-CD73 および S-CD73 score とした。同様に、腫瘍および間質におけるリンパ球密度をそれぞれ T-TIL および S-TIL score と定義した。さらに、IHC によって染色された CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, Foxp3<sup>+</sup>, CD163<sup>+</sup> 細胞を同定し、腫瘍および間質における各免疫細胞サブセットの密度を算出した。全ての解析結果は、臨床情報および転帰を知らされていない消化器内科医 1 名および病理医 1 名の計 2 名により確認された。

主要評価項目は CD73 発現と全生存期間（OS：手術から全死亡までの期間）との関連とし、副次評価項目として TIL と OS の関連、ならびに CD73 発現と免疫細胞浸潤の関連を検討した。統計解析は、Kaplan-Meier 法による生存曲線解析、log-rank 検定、および Cox 比例ハザードモデルによる単変量・多変量解析を実施した。また、CD73 発現と各免疫細胞密度の関連は Spearman の順位相関係数を用いて評価し、 $p$  値  $<0.05$  を統計学的有意とした。

### 【結果】

本研究では、根治切除を施行された胆道癌（BTC）患者 100 例を解析対象とした。内訳は肝内胆管癌 3 例（3%）、肝門部領域胆管癌 43 例（43%）、胆嚢癌 12 例（12%）、遠位胆管癌 26 例（26%）、乳頭部癌 16 例（16%）であった。UICC 第 8 版 TNM 分類による病期は、0 期 1 例（1%）、I 期 20 例（20%）、II 期 44 例（44%）、III 期 21 例（21%）、IV 期 14 例（14%）であった。

CD73 および TIL と生存期間の関連を検討した結果、腫瘍部 CD73 が高値の患者群（T-CD73 score high）は全生存期間（OS）の有意な短縮を示した（ $HR=1.973$ ,  $p=0.041$ ）。一方、間質部 CD73（S-CD73 score）における検討では有意差を認めなかった。TIL については、腫瘍部 TIL（T-TIL score）に関しては有意差を認めなかったが、間質部 TIL が高値の患者群（S-TIL score high）で有意に長い OS を示した（ $HR=0.485$ ,  $p=0.032$ ）。単変量解析では、リンパ節転移の有無、遠隔転移の有無、切除断端（R0/R1）、T-CD73 score（high/low）および S-TIL score（high/low）が OS と有意に関連した。多変量解析では、性別、遠隔転移の有無、切除断端（R0/R1）、T-CD73 score（high/low）が独立した予後因子として抽出された。

CD73 と TIL との相関解析では、T-CD73 score は T-TIL score（ $r=-0.264$ ,  $p=0.008$ ）および S-TIL score（ $r=-0.495$ ,  $p<0.001$ ）のいずれとも有意な負の相関を示した。S-CD73 score は S-TIL score と弱い負の相関を示したが（ $r=-0.208$ ,  $p=0.038$ ）、T-TIL score とは有意な相関を認めなかった。

さらに免疫細胞サブセットとの関連を解析した結果、T-CD73 score は T-CD3, CD8, Foxp3, CD163 score のいずれとも有意な相関を示さなかった。一方で、T-CD73 score は S-CD3 score（ $r=-0.246$ ,  $p=0.014$ ）および S-CD8 score（ $r=-0.266$ ,  $p=0.008$ ）と有意な負の相関を示し、腫瘍部における CD73 高発現が間質内の成熟 T リンパ球および細胞傷害性 T 細胞（CTL）浸潤を抑制することが示唆された。S-CD73 score は腫瘍部および間質部の CD3, CD8, Foxp3 score との関連を示さなかったが、間質部 CD163 score との間に有意な正の相関を認めた。

### 【考察】

本研究では、胆道癌（BTC）における腫瘍部および間質部の CD73 発現、腫瘍微小環境における免疫学的特徴、臨床転帰との関連を解析した。その結果、腫瘍部での

CD73 高発現は、間質内の T 細胞系列、特に細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の免疫抑制を介して予後不良と関連することが明らかとなった。

これまで胆道癌における CD73 発現と予後との関連は主に肝内胆管癌に限って報告されてきたが、本研究は胆道癌全体において腫瘍細胞の CD73 高発現が予後不良因子であることを明らかにした。

胆道癌における TIL の予後的意義は一貫していない。TIL は腫瘍免疫の重要な構成要素であり、その分布位置や密度、機能的特性が予後を規定するとされ、本研究では既報と同様に間質内 TIL (S-TIL) 密度の高さが良好な生存と関連し、腫瘍内 TIL (T-TIL) は予後と関連しなかった。これは、間質内 TIL が抗腫瘍免疫により寄与していることを支持する結果であった。

さらに、本研究では腫瘍内 CD73 発現が間質内 CD3<sup>+</sup> および CD8<sup>+</sup> T 細胞の密度と負の相関を示すことを明らかにし、CD73 が間質内の CTL 浸潤を選択的に抑制している可能性が示唆された。一方で、Foxp3<sup>+</sup> T 細胞や CD163<sup>+</sup> M2 マクロファージとの有意な相関は認められなかった。以上から、胆道癌において特に CTL を含む間質内の TIL 密度低下が腫瘍免疫の抑制において中心的な役割を担っていることが示唆された。

これまでに、胆道癌において CD73 発現と間質内 TIL の相関や予後との関連を検討した報告はない。DeepPathFinder™ を用いることで腫瘍内の CD73 発現が間質内の TIL 密度と負の相関を示すことを初めて明らかにし、腫瘍内 CD73 の発現上昇が間質内の CTL をはじめとするリンパ球浸潤を抑制することで予後悪化につながる可能性を示した。

本研究の限界として、単施設・後ろ向き研究である点、各部位・病期別の解析が症例数の制約で困難であった点、治療レジメン（特に抗 PD-1/PD-L1 抗体使用の有無）との関連を検討できなかった点が挙げられる。

#### 【結論】

胆道癌腫瘍部の CD73 発現上昇は間質内のリンパ球、特に CTL の機能を抑制することで免疫逃避を促進して、生存転帰を悪化させる。

## 略語表

|       |                                        |
|-------|----------------------------------------|
| AI    | artificial intelligence                |
| AMP   | adenosine monophosphate                |
| BTC   | biliary tract cancer                   |
| CD    | cluster of differentiation             |
| CTL   | cytotoxic T lymphocyte                 |
| DFS   | disease-free survival                  |
| FFPE  | formalin-fixed, paraffin-embedded      |
| Foxp3 | forkhead box P3                        |
| H&E   | hematoxylin and eosin                  |
| HR    | hazard ratio                           |
| HRP   | horseradish peroxidase                 |
| IHC   | immunohistochemistry                   |
| OS    | overall survival                       |
| PD-1  | programmed cell death protein 1        |
| PD-L1 | programmed death ligand 1              |
| S-1   | tegafur-gimeracil-oteracil potassium   |
| TIL   | tumor-infiltrating lymphocyte          |
| TME   | tumor microenvironment                 |
| TNM   | tumor, node, metastasis                |
| Treg  | regulatory T cell                      |
| UICC  | Union for International Cancer Control |

## 緒言

胆道癌 (Biliary tract cancer: BTC) は、日本における悪性腫瘍のうち、膵癌に次いで生存率が低く、年間約 2 万人の死亡が報告されている (National Cancer Center Japan, 2022). 早期発見が困難であるため、多くの患者は治癒切除が不可能な進行期で診断され、しばしば全身化学療法が必要となる。近年の治療の進歩にもかかわらず、BTC は依然として極めて難治性であり、5 年全生存率 (OS) は 20~30% 未満にとどまっていることから、より有効な治療戦略の確立が急務である (National Cancer Center Japan, 2022).

外科的切除は BTC に対する標準的な第一選択治療であるが、術後再発は依然として多い。術後補助化学療法は、手術単独と比較して生存率の改善を示している (Nakachi et al, 2023). 切除不能症例に対しては、日本においてゲムシタビン (GEM)、シスプラチン (CDDP)、S-1 の三剤併用療法が GEM+CDDP 療法に対して優越性を示した (Sakai et al, 2018). さらに近年では、ペムブロリズマブ (抗 PD-1 抗体) (Valle et al, 2020) やデュルバルマブ (抗 PD-L1 抗体) (Oh et al, 2022) などの免疫チェックポイント阻害薬を GEM+CDDP に追加することで臨床的有用性が示されている。それでもなお、奏効率 (ORR) は約 20~30% にとどまり更なる治療法の改善や開発が待たれる。

CD73 は、細胞膜上に存在するエクトヌクレオチダーゼであり、アデノシンーリン酸 (AMP) をアデノシンに加水分解する酵素で、さまざまな細胞に広く発現している。低酸素状態や炎症下では CD73 の発現により細胞外アデノシン濃度が上昇し、炎症抑制、血管新生促進、および細胞外マトリックスとの相互作用調節を通じて組織保護に寄与することが知られている (Zimmermann et al, 2012; Colgan et al, 2006; Haskó et al, 2008).

腫瘍微小環境 (tumor microenvironment: TME) においては、CD73 が腫瘍増殖、血管新生および免疫寛容を促進することが複数の実験モデルで示されている (Gao et al, 2017; Wang et al, 2011). また、TME に特徴的な低酸素条件下では CD73 の過剰発現が誘導され、これが腫瘍の進行や予後不良と関連することが、膠芽腫、黒色腫、乳癌、大腸癌、膵癌、および胆道癌などの複数の悪性腫瘍で報告されている (Xu et al, 2013; Wang et al, 2012; Zhi et al, 2012; Wu et al, 2012; Zhang et al, 2015; Turcotte et al, 2015; Wang et al, 2017; Sciarra et al, 2019; Xu et al, 2021) (図 1).

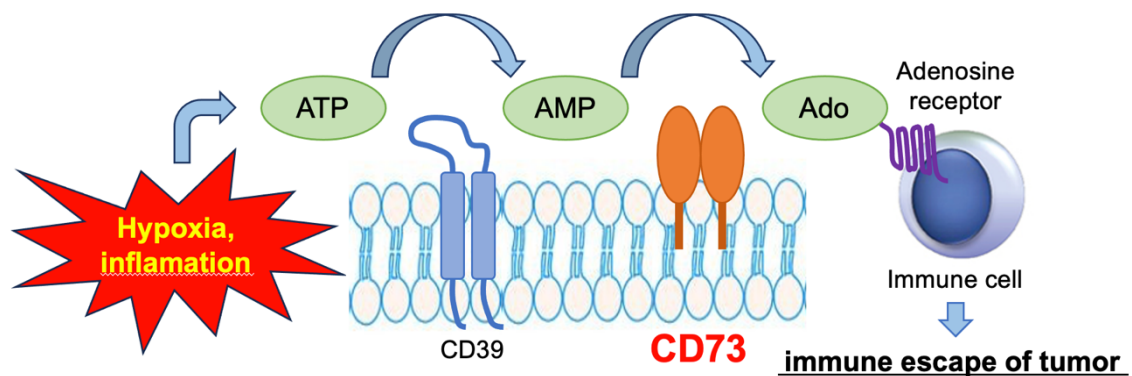


図1 腫瘍微小環境下における CD73 の作用

低酸素状態である腫瘍微小環境では細胞外 ATP 濃度が上昇するため、腫瘍細胞の CD73 発現が上昇しアデノシンへの分解が促進される。アデノシンが免疫細胞と結合することで腫瘍細胞が免疫逃避を起こす (Samaneh et al, 2019)。

BTC において腫瘍内の CD73 発現を検討した研究は限られているが、これらの報告では高 CD73 発現がリンパ節転移や予後不良と関連する可能性が示唆されている (Jiang et al, 2018)。しかしながら、CD73 が TME にどのような影響を与えるのか、予後の悪化に寄与する詳細な機序は未だ明らかでない。

さらに、腫瘍要因に加えて、TME 内の免疫細胞も予後を規定する重要な要素として注目されている。複数の固形癌において、CD3<sup>+</sup> または CD8<sup>+</sup> T 細胞の高度浸潤は一般的に良好な臨床転帰と関連している (Gao et al, 2020; Pagès et al, 2018)。一方、制御性 T 細胞や M2 マクロファージの浸潤増加は免疫抑制および予後不良と関連することが報告されている (Pan et al, 2025; Cao et al, 2019)。同様の傾向は BTC でも観察されており、CD8<sup>+</sup> T 細胞の数または密度の上昇が OS や無再発生存期間 (DFS) の延長と関連し、Foxp3<sup>+</sup> T 細胞の増加は OS の短縮と関連している (Tao et al, 2022; Liu et al, 2022)。

CD73 発現亢進の機序は完全には解明されていないが、近年の研究では、CD73 を介した免疫抑制が腫瘍の転移能や免疫チェックポイント阻害薬に対する耐性に関与する可能性が示唆されている (Wang et al, 2012; Cao et al, 2022)。BTC においても免疫療法の適応拡大が今後も増えていくことが予想される中、CD73 が TME 内の免疫細胞動態に及ぼす影響や臨床転帰との関連を明らかにすることは、治療戦略の最適化に向けて重要な知見を提供する可能性がある。

本研究は、胆道癌における CD73 発現と腫瘍免疫微小環境の特徴および臨床転帰との関連を明らかにすることを目的とした。

## 方法

### 【対象患者】

本研究は、18歳以上の胆道癌（BTC）患者を対象とした単施設後ろ向きコホート研究である。対象は、2018年1月から2023年2月までに北海道大学病院で、初回治療として外科的根治切除が施行された胆道癌患者であり、肝内胆管癌、肝門部領域胆管癌、胆嚢癌、遠位胆管癌、および十二指腸乳頭部癌を含んだ。また、オプトアウトを希望しなかった患者を登録対象とした。

除外基準は、①胆道癌診断の3年以内に他の悪性腫瘍の既往を有する者、②臨床情報が不十分で研究責任者が不適当と判断した者、③本人または法的代理人による研究参加への同意が得られなかった者とした。

登録患者については、年齢、性別、身体所見、既往歴、診断、前治療の有無、治療内容と転帰、症状、Performance Status、生存データ、飲酒歴、喫煙歴、アレルギー歴、家族歴などの臨床情報を収集した。また、生検標本および切除標本から得られた病理学的所見も解析対象とした。

### 【検体】

切除された検体から作製されたホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）ブロックを5μm厚に薄切した。腫瘍組織量が最も多いブロックを選択し、挫滅の強い標本や腫瘍量が不十分な標本は除外した。すべての標本は消化器内科医1名、および病理医1名の計2名が独立して確認し、評価の妥当性を検証した。Hematoxylin and eosin（H&E）染色スライドと未染標本を作製し、未染標本に対して免疫組織化学（immunohistochemistry: IHC）染色を施行した。

### 【免疫染色】

適格標本は、以下の一次抗体を用いてIHC染色を行った：抗CD73 ウサギモノクローナル抗体（#13160, Cell Signaling Technology, USA, 希釈 1:100）、抗CD3 ウサギポリクローナル抗体（Dako #IR503, Agilent, USA）、抗CD8 マウスモノクローナル抗体（Dako #IR623, Agilent, USA）、抗CD163 マウスモノクローナル抗体（#CD163-L-CE, Leica Biosystems, Germany, 希釈 1:500）、抗Foxp3 ウサギモノクローナル抗体（#ab20034, abcam, UK, 希釈 1:100）。

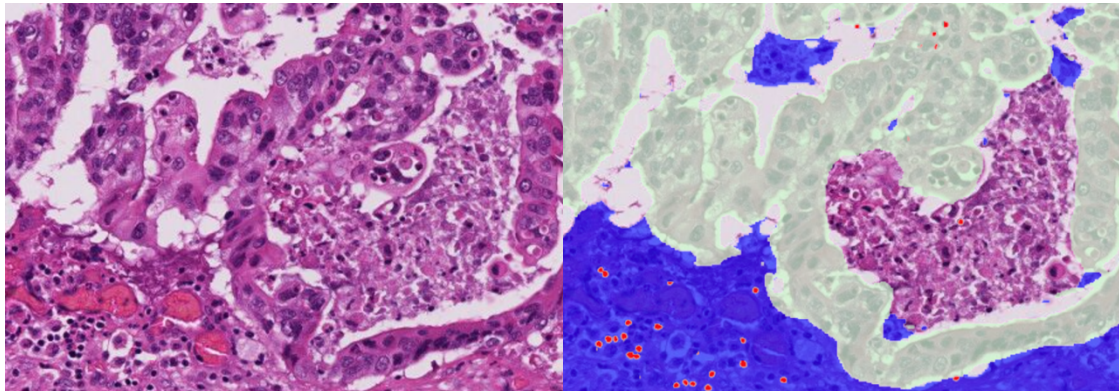
CD3, CD8, Foxp3 陽性リンパ球およびCD163 陽性免疫細胞は、それぞれ成熟Tリンパ球、細胞傷害性T細胞（CTL）、制御性T細胞（Treg）、M2マクロファージを表すものとした。発色には、ペルオキシダーゼ標識ポリマー法を用い、二次抗体としてEnVision FLEX/HRP goat secondary antibody（Dako #SM802, Agilent, USA）を使用した。

### 【画像解析】

Tumor bed（腫瘍床）は以下の手順で定義した。まず、手術標本の H&E 染色スライドを光学顕微鏡下で観察し、腫瘍領域を手動で概略的にトレースした後、バーチャルスライドとしてデジタル化した。次に、各スライド上で腫瘍細胞の最深浸潤部を詳細に同定し、その境界を腫瘍床境界として再定義して tumor bed 領域を決定、本研究における TME の代表領域とした。

すべての H&E および IHC スライドは、NanoZoomer 2.0HT Digital Slide Scanner（浜松ホトニクス株式会社、静岡、日本）を用い、20 倍の倍率で全スライド画像をバーチャルスライド化した。

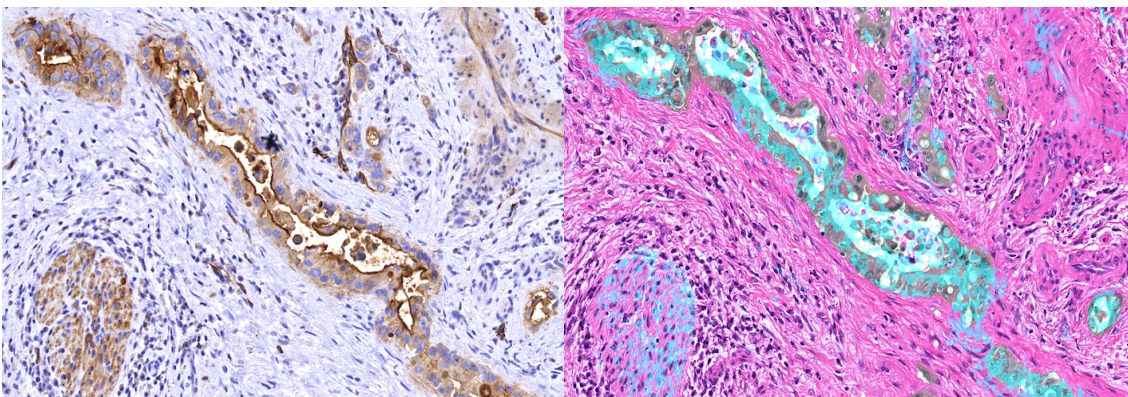
腫瘍上皮および間質内におけるリンパ球密度を定量化するため、本研究では AI を用いた病理画像解析システム DeepPathFinder™ (biomy inc., Tokyo, Japan) を使用した。DeepPathFinder™ には、病理組織画像における上皮領域およびリンパ球の検出に特化して最適化された深層学習ベースのセグメンテーションモデルが組み込まれており、AI モデルは、がん組織のセグメンテーションのために構築された大規模かつ標準化されたデータセットである SegPath データセットを用いて学習および検証を行った (Komura et al, 2023)。モデルの堅牢性を確保するため、Komura らが報告したプロトコルに従いデータセットを学習用、検証用、およびテスト用に分割し、上皮セグメンテーションモデルは 21,912 枚の学習画像、2,259 枚の検証画像、2,338 枚のテスト画像を用いて構築し、リンパ球検出モデルは 10,453 枚の画像を用いて学習し、1,082 枚および 738 枚をそれぞれ検証およびテストに使用した (Komura et al, 2023)。これにより H&E 染色されたバーチャルスライド上で腫瘍上皮、間質、リンパ球を自動的に識別し、各領域内の細胞密度を面積で定量化することが可能である (<https://www.biomy-tech.com/deeppathfinder>) (図 2)。



**図2 H&E 染色画像および DeepPathFinder™による画像解析**

H&E 染色画像（左）を DeepPathFinder™で解析することで腫瘍領域（緑）および間質領域（青）を自動的に解析・色分けし面積として数値化される．また tumor bed 内のリンパ球（赤）を検出してそれぞれ腫瘍、間質領域内のリンパ球を面積として算出する．

さらに、免疫染色（IHC）スライドを H&E 染色スライドと正確に重ね合わせることで、H&E 染色で同定された腫瘍上皮および間質内において免疫染色により染色された領域を面積として算出することが可能となる（図3、図4）（Kobayashi et al, 2024）．免疫染色の陽性領域は、病理医が設定した染色強度の閾値を用いてデジタル画像解析により同定した．



**図3 CD73 による IHC 画像および DeepPathFinder™による画像解析**

CD73 による IHC 画像（左）を DeepPathFinder™で解析することで IHC 陽性領域（水色）を自動的に解析され、H&E 染色画像で認識された腫瘍領域（緑）と重ね合わせることで腫瘍領域における CD73 陽性面積が数値化される（右）．

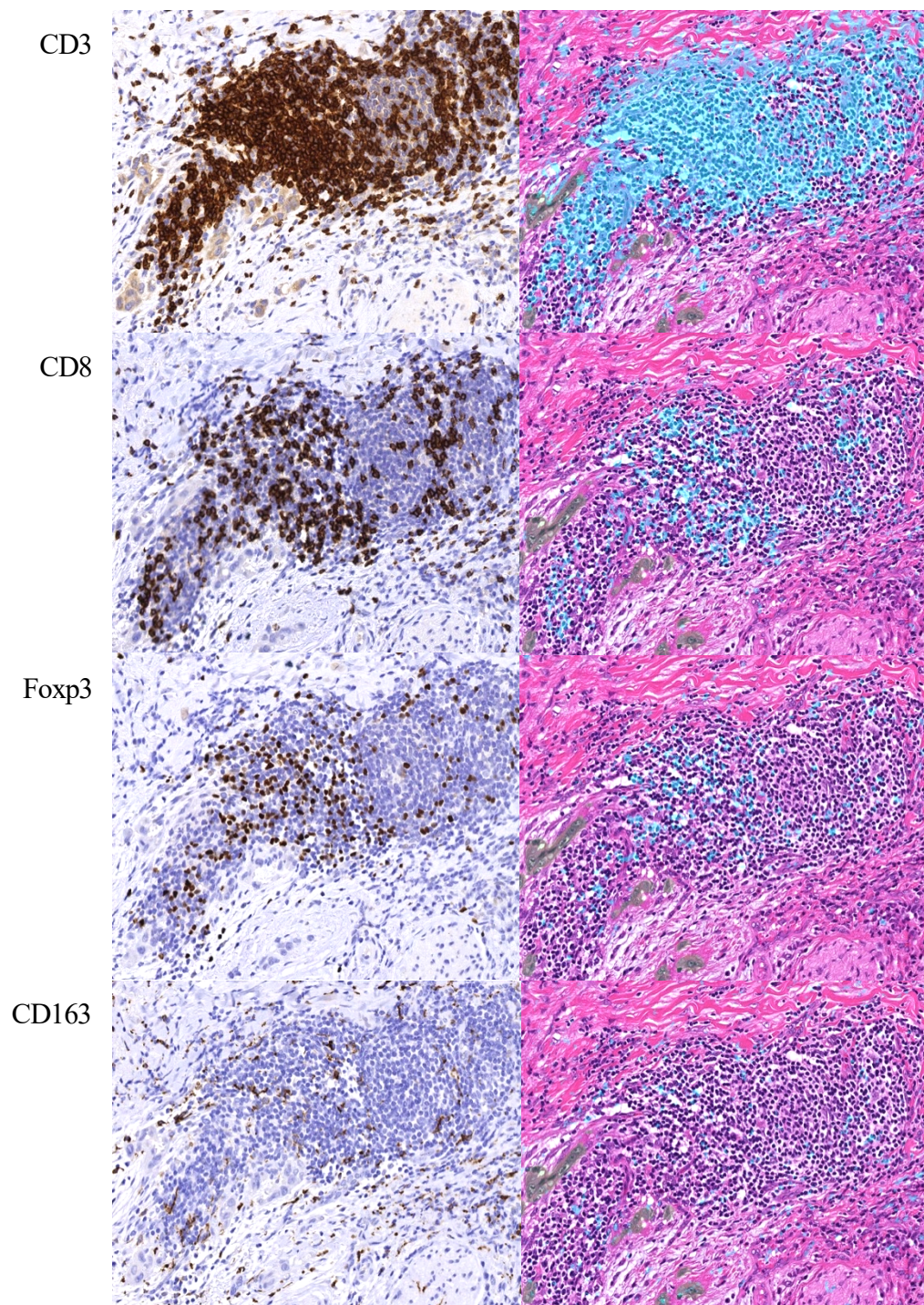


図4 各免疫細胞の IHC 画像および DeepPathFinder™による画像解析  
CD3, CD8, Foxp3, CD163 による IHC 画像（左）を DeepPathFinder™で解析し IHC 陽性領域（水色）を自動的に面積として数値化される（右）.

本研究で tumor bed 内における腫瘍上皮および間質の同定，および腫瘍組織に浸潤するすべてのリンパ球として定義される腫瘍浸潤リンパ球（tumor-infiltrating

lymphocytes: TILs) の解析を H&E スライドを用いて行なった。腫瘍部および間質部での CD73 発現ならびに CD3 陽性リンパ球 (成熟 T リンパ球), CD8 陽性リンパ球 (細胞傷害性 T 細胞 : CTL), Foxp3 陽性リンパ球 (制御性 T 細胞 : Treg), および CD163 陽性免疫細胞 (M2 マクロファージ) の分布の評価を H&E スライドおよび IHC スライドから, DeepPathFinder™ を用いて定量評価した (Asano et al, 2025)

### 【評価方法】

TIL の評価では, H&E 染色スライド上で同定された腫瘍および間質領域内の浸潤リンパ球を単位面積あたりの面積として算出し, T-TILscore および S-TILscore と定義した。

また免疫染色を用いた CD73 の発現や各免疫細胞サブセット (CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, Foxp3<sup>+</sup>, CD163<sup>+</sup>細胞) の評価は, DeepPathFinder™で各 IHC スライドと H&E 染色スライドを重ね合わせて腫瘍および間質領域内における各 IHC スライドの陽性面積を算出し, 腫瘍および間質領域内の単位面積あたりの各 IHC 陽性面積を T-CD73/CD3/CD8/Foxp3/CD163score および S-CD73/CD3/CD8/Foxp3/CD163 score と定義した (図 5)。

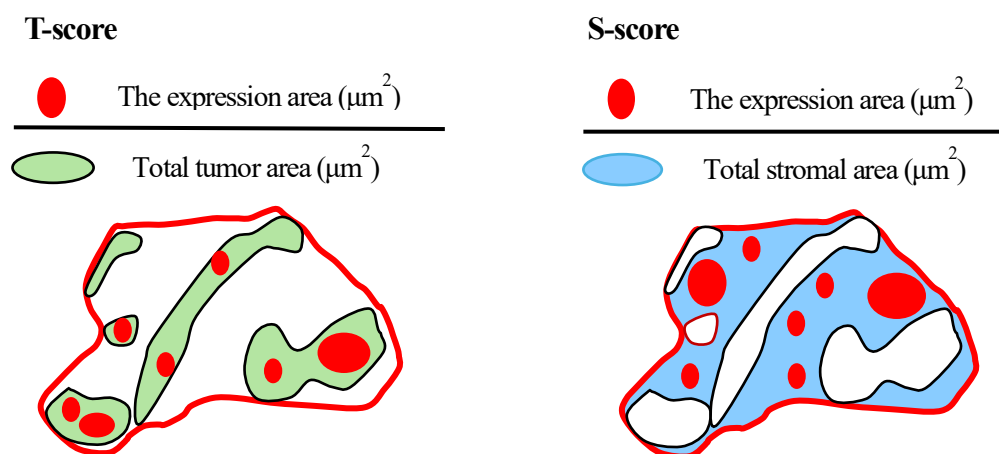


図 5 T-score および S-score の模式図

Tumor bed 内の腫瘍／間質領域における TIL の面積 (H&E 染色スライドで算出) および CD73 (CD3, CD8, Foxp3, CD163) の発現する面積の割合をそれぞれ T-TIL score, T-CD73, CD3, CD8, Foxp3, CD163 score および S-TIL score, S-CD73 (CD3, CD8, Foxp3, CD163) score と定義した。

Tumor bed の領域設定, 免疫染色の妥当性, および DeepPathFinder™による CD73 陽

性細胞およびリンパ球検出の正確性は、消化器内科医（S.S.）および病理医（K.C.H.）が臨床病理学的情報および患者転帰を盲検化した状態で独立して検証した。

#### 【評価項目】

主要評価項目は CD73 発現と全生存期間（OS）との関連とし、OS は手術日からあらゆる原因による死亡までの期間と定義した。副次評価項目は、TIL と OS の関連、および CD73 発現と TIL の関連、CD73 発現と免疫細胞浸潤の関連とした。OS 解析では、T-CD73, S-CD73, T-TIL, S-TIL の各スコアについて、カットオフ値設定に際して ROC 曲線解析を実施したが、AUC = 0.542 と低値であったことから ROC に基づく最適カットオフは採用せず、中央値で二分し、高値群（high）と低値群（low）間で比較を行った。

#### 【統計解析】

統計解析は R version 4.3.2（The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria）用のグラフィカルユーザーインターフェースである EZR version 1.68（Saitama Medical Center, Jichi Medical University）（Kanda, 2013）を用いて実施した。

2 群間の臨床病理学的特徴の差を検討するため、カイ二乗検定または Fisher の正確比検定を用いた。全生存期間（OS）は Kaplan–Meier 法により推定し、95%信頼区間（CI）を算出した。群間比較には log-rank 検定を用いた。ハザード比（HR）は Cox 比例ハザード回帰分析により算出した。

単変量 Cox 比例ハザード解析を行い全生存期間に関連する可能性のある予後因子を抽出した。単変量解析で  $p$  値  $< 0.10$  を示した変数を多変量 Cox 比例ハザードモデルに投入し、潜在的交絡因子を調整したうえで BTC 患者の独立した予後因子を検討した。

CD73 発現と TIL, CD3 陽性リンパ球（成熟 T 細胞）、CD8 陽性リンパ球（CTL）、Foxp3 陽性リンパ球（Treg）、および CD163 陽性免疫細胞（M2 マクロファージ）との相関は、Spearman 順位相関係数を用いて解析した。 $p$  値  $< 0.05$  を統計学的有意とした。

#### 【研究倫理】

本研究は北海道大学病院倫理審査委員会の承認を得て実施された（承認番号：023-0102）。また、UMIN 臨床試験登録システム（UMIN000051855）に登録し、病院ホームページ上で情報公開を行った（<https://www.huhp.hokudai.ac.jp/>）。後ろ向き研究であるため、個別の同意取得は免除された。すべての研究は 2024 年改訂ヘルシンキ宣言および「人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針」（令和 3 年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号、令和 5 年 3 月 27 日一部改正）、ならびに STROBE ガイドラインに準拠して実施した。

## 結果

### 【対象症例の臨床学的特性】

本研究には、初回治療として外科的根治切除が施行された胆道癌患者 100 例が登録された (図 6). 内訳は、肝内胆管癌 (IHCC) 3 例 (3%), 肝門部領域胆管癌 (PHCC) 43 例 (43%), 胆嚢癌 (GBC) 12 例 (12%), 遠位胆管癌 (DBC) 26 例 (26%), 乳頭部癌 (AC) 16 例 (16%) であった. UICC 第 8 版 TNM 分類では, Stage 0 が 1 例 (1%), Stage I が 20 例 (20%), Stage II が 44 例 (44%), Stage III が 21 例 (21%), Stage IV が 14 例 (14%) であった (表 1).

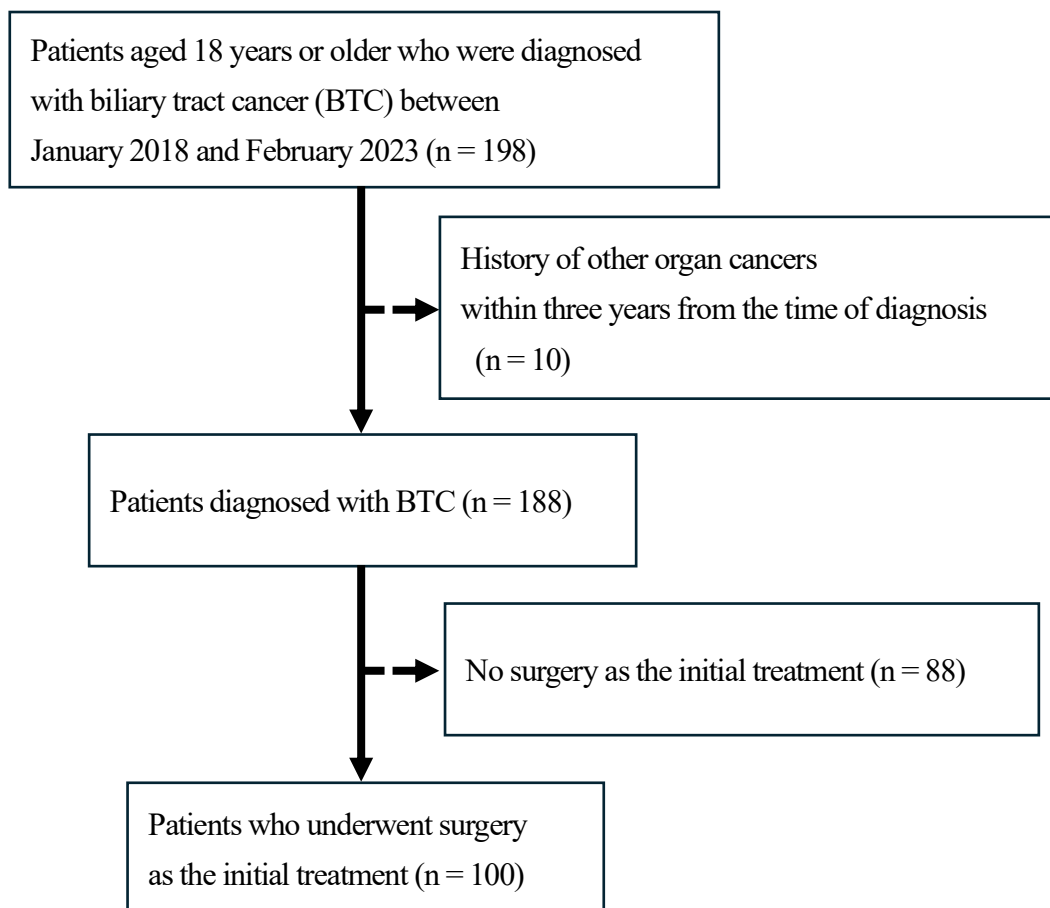


図 6 症例選定におけるフローチャート

2018 年 1 月から 2023 年 2 月の間で北海道大学病院にて胆道癌と診断された 18 歳以上の症例 198 例のうち、診断から 3 年以内に他臓器を指摘された患者 10 例、初回治療で手術を行われなかった 88 例を除く計 100 例を解析対象とした (表 1).

**表 1. 対象症例の臨床病理学的特性**

対象症例のうち原発部位は肝内胆管が最も少なく肝門部領域胆管が最も多く、全死亡数は38例であった。

|                              | Total n = 100         |
|------------------------------|-----------------------|
| Age, year median (range)     | 72 (27 - 87)          |
| Sex, n                       |                       |
| Male / Female                | 72 / 28               |
| Primary tumor location, n    |                       |
| IHCC / PHCC / GBC / DCC / AC | 3 / 43 / 12 / 26 / 16 |
| Clinical stage*, n           |                       |
| 0 / I / II / III / IV        | 1 / 20 / 44 / 21 / 14 |
| T stage*, n                  |                       |
| Tis / T1 / T2 / T3 / T4      | 1 / 20 / 56 / 18 / 5  |
| N stage*, n                  |                       |
| N0 / N1, 2                   | 61 / 39               |
| M stage*, n                  |                       |
| M0 / M1                      | 89 / 11               |
| Residual tumor, n            |                       |
| R0 / R1                      | 78 / 22               |
| Adjuvant therapy, n          |                       |
| Yes / No                     | 24 / 76               |
| Number of deaths, n          | 38                    |

\*UICC, Union for international Cancer Control classification of malignant tumors, 8th edition  
 IHCC, intrahepatic cholangiocarcinoma; PHCC, perihilar cholangiocarcinoma; GBC, gallbladder carcinoma; DCC, distal cholangiocarcinoma; AC, ampullary carcinoma

【DeepPathFinder™を用いた H&E 染色および免疫染色解析】

CD73 score, CD3 score, CD8 score, Foxp3 score, CD163 score, TIL score の中央値および範囲は表 2 に示す.

**Table 2.** T- and S-score of parameters

|       | Median ( $\times 10^4$ , range) |                   |
|-------|---------------------------------|-------------------|
|       | T-score                         | S-score           |
| CD73  | 1346 (28.1–7120)                | 716.7 (65.5–3812) |
| CD3   | 637.7 (7.5–3864)                | 639.2 (44.4–2716) |
| CD8   | 146.2 (0.82–1637)               | 222.0 (9.6–1828)  |
| Foxp3 | 19.2 (0.47–626.7)               | 27.5 (1.0–415.9)  |
| CD163 | 237.9 (10.8–4809)               | 380.9 (37.2–2119) |
| TIL   | 3.6 (0.33–45.0)                 | 81.7 (4.4–682.6)  |

T-, tumor-; S-, stroma-; TIL, tumor-infiltrating lymphocyte

【CD73 および TIL の全生存期間に対する影響】

各 score (T-CD73, S-CD73, T-TIL, S-TIL) について中央値で高低の 2 群に層別し, high 群, low 群の全生存期間 (OS) を比較した.

まず CD73 score について, low 群および high 群それぞれの臨床病理学的特性を比較すると, T-CD73 score high 群では low 群と比較しリンパ節転移を来した症例が有意に多かった. 一方 S-CD73 score については low 群/ high 群間に臨床病理学的特性に有意差は見られなかった (表 3).

**表3 T-, S-CD73 score low 群/ high 群の臨床病理学的特性**

T-CD73 score 高値群でリンパ節転移を来した症例が有意に多かった. 一方 S-CD73 score については low 群/ high 群間に臨床病理学的特性に有意差は見られなかった.

| Characteristics           | T-CD73 score     |                 | p-value | S-CD73 score     |                  | p-value |
|---------------------------|------------------|-----------------|---------|------------------|------------------|---------|
|                           | Low (n = 50)     | High (n = 50)   |         | Low (n = 50)     | High (n = 50)    |         |
| Age, year median (range)  | 72 (27-87)       | 72 (27-83)      | 0.852   | 71 (54-83)       | 72 (27-87)       | 0.712   |
| Sex, n                    |                  |                 |         |                  |                  |         |
| Male/ Female              | 39/ 11           | 33/ 17          | 0.265   | 38/ 12           | 34/ 16           | 0.504   |
| Primary tumor location, n |                  |                 |         |                  |                  |         |
| IHCC/ PHCC/ GBC/ DCC/ AC  | 2/ 16/ 9/ 13/ 10 | 1/ 27/ 3/ 13/ 6 | 0.128   | 2/ 23/ 7/ 13/ 5  | 1/ 20/ 5/ 13/ 11 | 0.537   |
| Clinical stage*, n        |                  |                 |         |                  |                  |         |
| 0/ I/ II/ III/ IV         | 1/ 15/ 22/ 7/ 5  | 0/ 5/ 22/ 14/ 9 | 0.050   | 0/ 13/ 20/ 11/ 6 | 1/ 7/ 24/ 10/ 8  | 0.478   |
| T stage, n                |                  |                 |         |                  |                  |         |
| Tis/ T1/ T2/ T3/ T4       | 1/ 15/ 25/ 7/ 2  | 0/ 5/ 31/ 11/ 3 | 0.102   | 0/ 14/ 25/ 9/ 2  | 1/ 6/ 31/ 9/ 3   | 0.283   |
| N stage, n                |                  |                 |         |                  |                  |         |
| N0/ N1,2                  | 37/ 13           | 24/ 26          | 0.013   | 35/ 15           | 26/ 24           | 0.100   |
| M stage, n                |                  |                 |         |                  |                  |         |
| M0/ M1                    | 45/ 5            | 44/ 6           | 1.000   | 44/ 6            | 45/ 5            | 1.000   |
| Residual tumor, n         |                  |                 |         |                  |                  |         |
| R0/ R1                    | 40/ 10           | 38/ 12          | 0.810   | 38/ 12           | 40/ 10           | 0.810   |
| Adjuvant therapy, n       |                  |                 |         |                  |                  |         |
| Yes/ No                   | 10/ 40           | 14/ 36          | 0.483   | 13/ 37           | 11/ 39           | 0.815   |
| Number of deaths, n       | 16               | 22              | 0.303   | 20               | 18               | 0.837   |

\*UICC, Union for international Cancer Control classification of malignant tumors, 8th edition

IHCC, intrahepatic cholangiocarcinoma; PHCC, perihilar cholangiocarcinoma; GBC, gallbladder carcinoma; DCC, distal cholangiocarcinoma; AC, ampullary carcinoma

また T-, S-CD73 score のそれぞれ OS の比較を行うと、T-CD73 score について、high 群の OS 中央値は 43.0 か月 [95% 信頼区間 (CI), 22.7-not reached (NR)], low 群は NR (95%CI, 45.6-NR) であり、high 群で予後不良であった (HR 1.97; 95%CI, 1.03-3.79;  $p=0.041$ )。一方 S-CD73 score について、high 群対 low 群は OS 中央値 49.1 か月 (95% CI, 40.5-NR) 対 50.2 か月 (95%CI, 31.3-NR) で有意差はなかった (HR 0.96; 95% CI, 0.51-1.82;  $p=0.898$ ) (図 7)。

## CD73 score

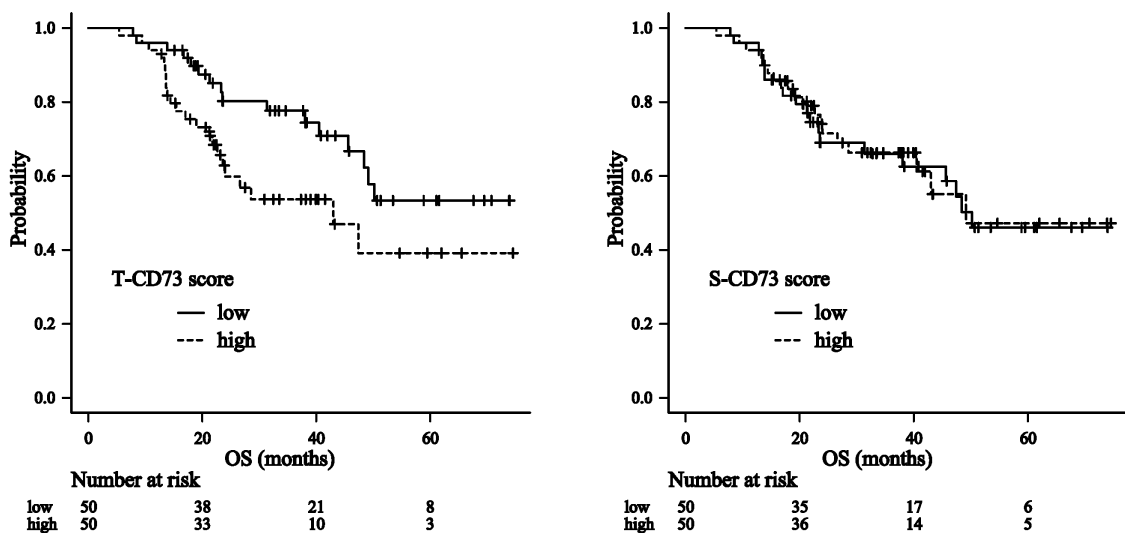


図 7 CD73 score low 群/ high 群別全生存期間 (OS) の Kaplan-Meier 曲線

T-CD73 score が high 群で OS の短縮を認めた (HR 1.97; 95%CI, 1.03-3.79;  $p=0.041$ ) が S-CD73 score は OS への関与は認めなかった (HR 0.96; 95%CI, 0.51-1.82;  $p=0.898$ )。

次に TIL score について、low 群および high 群それぞれの臨床病理学的特性を比較すると、T-TIL score low 群でリンパ節転移を来した症例が有意に多かった。一方 S-TIL score には low 群で T stage が進行した症例、リンパ節転移を来した症例が有意に多かった (表 4)。

表 4 T-, S-TIL score low 群/ high 群の臨床病理学的特性

T-TIL score low 群でリンパ節転移を来した症例が有意に多かった。一方 S-TIL score には low 群で T stage が進行した症例，リンパ節転移を来した症例が有意に多かった。

| Characteristics           | T-TIL score     |                 | S-TIL score     |                 | p-value |
|---------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------|
|                           | Low (n = 50)    | High (n = 50)   | Low (n = 50)    | High (n = 50)   |         |
| Age, year median (range)  | 72 (27-84)      | 71.5 (50-87)    | 71 (27-82)      | 72 (50-87)      | 0.188   |
| Sex, n                    |                 |                 |                 |                 |         |
| Male/ Female              | 33/ 17          | 39/ 11          | 35/ 15          | 37/ 13          | 0.824   |
| Primary tumor location, n |                 |                 |                 |                 |         |
| IHCC/ PHCC/ GBC/ DCC/ AC  | 1/ 20/ 5/ 15/ 9 | 2/ 23/ 7/ 11/ 7 | 2/ 23/ 3/ 14/ 8 | 1/ 20/ 9/ 12/ 8 | 0.449   |
| Clinical stage*, n        |                 |                 |                 |                 |         |
| 0/ I/ II/ III/ IV         | 0/ 7/ 22/ 13/ 8 | 1/ 13/ 22/ 8/ 6 | 0/ 5/ 23/ 13/ 9 | 1/ 15/ 21/ 8/ 5 | 0.077   |
| T stage, n                |                 |                 |                 |                 |         |
| Tis/ T1/ T2/ T3/ T4       | 0/ 7/ 29/ 11/ 3 | 1/ 13/ 27/ 7/ 2 | 0/ 7/ 24/ 15/ 4 | 1/ 13/ 32/ 3/ 1 | 0.004   |
| N stage, n                |                 |                 |                 |                 |         |
| N0/ N1,2                  | 24/ 26          | 37/ 13          | 25/ 25          | 36/ 14          | 0.040   |
| M stage, n                |                 |                 |                 |                 |         |
| M0/ M1                    | 43/ 7           | 46/ 4           | 44/ 6           | 45/ 5           | 1.000   |
| Residual tumor, n         |                 |                 |                 |                 |         |
| R0/ R1                    | 38/ 12          | 40/ 10          | 35/ 15          | 43/ 7           | 0.090   |
| Adjuvant therapy, n       |                 |                 |                 |                 |         |
| Yes/ No                   | 16/ 34          | 8/ 42           | 16/ 34          | 8/ 42           | 0.815   |
| Number of deaths, n       | 20              | 18              | 22              | 16              | 0.303   |

\*UICC, Union for international Cancer Control classification of malignant tumors, 8th edition

IHCC, intrahepatic cholangiocarcinoma; PHCC, perihilar cholangiocarcinoma; GBC, gallbladder carcinoma; DCC, distal cholangiocarcinoma; AC, ampullary carcinoma

また T-, S-TIL score のそれぞれ OS の比較を行うと、T-TIL score high 群対 low 群は OS 中央値 NR (95%CI, 38.1-NR) 対 45.6 か月 (95%CI, 28.6-NR) で有意差はなかった (HR 0.78 ; 95%CI, 0.41-1.49 ;  $p=0.456$ )。一方 S-TIL score high 群対 low 群は OS 中央値 NR (95%CI, 45.6-NR) 対 43.0 か月 (95%CI, 23.0-48.4) で high 群が予後良好であった (HR 0.49 ; 95%CI, 0.25-0.94 ;  $p=0.032$ ) (図 8)。

## TIL score

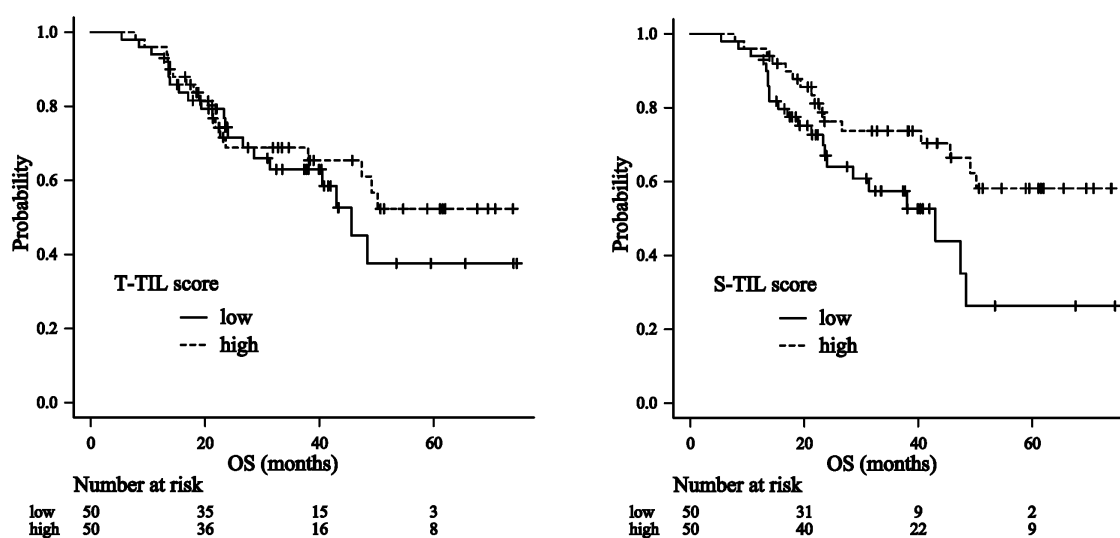


図 8 TIL score low 群/ high 群別 OS の Kaplan-Meier 曲線

T-TIL score は OS への関与は認めなかった (HR 0.78 ; 95%CI, 0.41-1.49 ;  $p=0.456$ ) が, S-TIL score は高値群で OS の延長を認めた (HR 0.49 ; 95%CI, 0.25-0.94 ;  $p=0.032$ )。

## 【CD73 と TIL との相関】

Spearman 順位相関係数の解析では、T-CD73 score は T-TIL score ( $r=-0.264$ ,  $p=0.008$ ) および S-TIL score ( $r=-0.495$ ,  $p<0.001$ ) といずれも有意な負の相関を示した。一方, S-CD73 score は S-TIL score と弱い負の相関を示した ( $r=-0.208$ ,  $p=0.038$ ) が, T-TIL score とは有意な相関を示さなかった ( $r=-0.191$ ,  $p=0.057$ ) (図 9)。

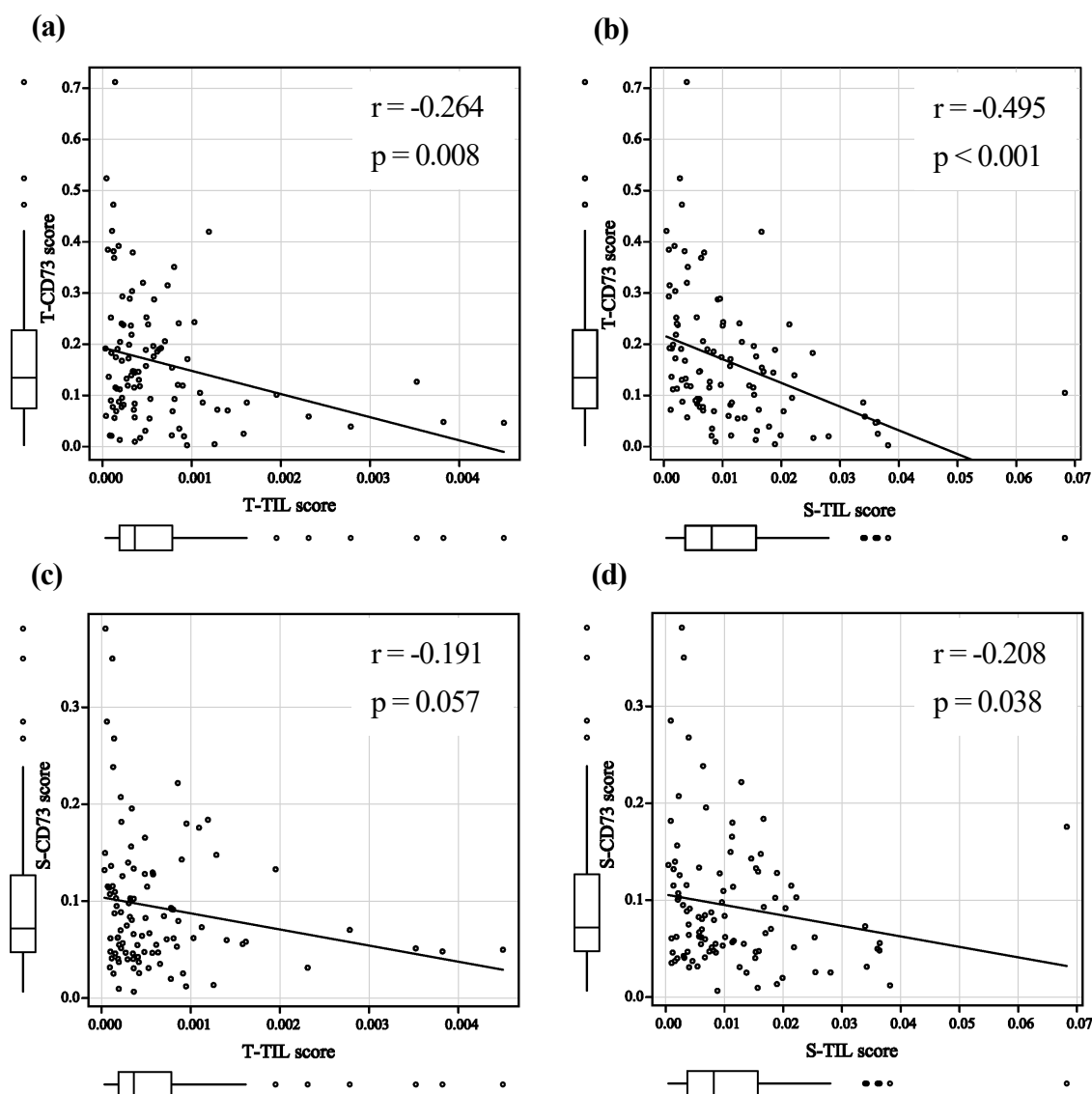


図9 CD73score と TILscore の相関

(a) T-CD73 と T-TIL (b) T-CD73 と S-TIL (c) S-CD73 と T-TIL (d) S-CD73 と S-TIL の相関を Spearman の順位相関係数を用いて評価した. (b) で中等度の相関, (a) (d) で弱い相関を示した.

T-CD73 score と臨床病理学的因子および予後との関連を評価するため, 単変量解析および多変量解析を行った. 単変量解析では, リンパ節転移の有無, 遠隔転移の有無, 切除断端 (R0/R1), T-CD73 score (high/low) および S-TIL score (high/low) が OS と有意に関連した. さらに, T-CD73 score が他の臨床病理学的因子とは独立して OS に関連するかを検討するため, 単変量解析で  $p < 0.1$  を示した因子を共変量として多変量解析を行ったところ, 性別, 遠隔転移の有無, 切除断端 (R0/R1) および T-CD73 score が独立した予後因子として同定された (表 5).

表 5 胆道癌における予後因子に関する単変量および多変量 Cox 比例ハザード解析  
ハザード比 (HR) は 95%信頼区間 (95%CI) を付して示した. T- ; 腫瘍部 (tumor),  
S- ; 間質部 (stroma), TIL ; 腫瘍浸潤リンパ球 (tumor-infiltrating lymphocyte), CI ; 信  
頼区間 (confidence interval).

| Characteristics  | Univariate analysis |                     | Multivariate analysis |         |
|------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|---------|
|                  | HR (95%CI)          | p-value             | HR (95%CI)            | p-value |
| Age, year        | 70 <                | 1.023 (0.523-2.001) |                       | 0.947   |
| Sex              | Female              | Reference           |                       |         |
|                  | Male                | 2.517 (0.980-6.465) | Reference             | 0.008   |
| T stage          | Tis, T1, T2         | Reference           |                       |         |
|                  | T3, T4              | 1.707 (0.817-3.568) |                       | 0.155   |
| N stage          | N0                  | Reference           |                       |         |
|                  | N1, N2              | 2.110 (1.114-3.997) | Reference             | 0.208   |
| M stage          | M0                  | Reference           |                       |         |
|                  | M1                  | 4.106 (1.806-9.334) | Reference             | 0.008   |
| Resection margin | R0                  | Reference           |                       |         |
|                  | R1                  | 2.777 (1.426-5.406) | Reference             | 0.011   |
| Adjuvant therapy | No                  | Reference           |                       |         |
|                  | Yes                 | 0.833 (0.345-2.012) |                       | 0.685   |
| T-CD73score      | Low                 | Reference           |                       |         |
|                  | High                | 1.973 (1.027-3.790) | Reference             | 0.019   |
| S-TILscore       | Low                 | Reference           |                       |         |
|                  | High                | 0.485 (0.250-0.940) |                       | 0.032   |

T-, tumor-; S-, stroma-; TIL-, tumor-infiltrating lymphocyte; HR, hazard ratio; CI, confidence interval

### 【CD73 と免疫細胞サブセットとの相関】

T-CD73 score は、T-CD3 ( $r=-0.136, p=0.180$ ), T-CD8 ( $r=-0.174, p=0.084$ ), T-Foxp3 ( $r=0.081, p=0.423$ ), および T-CD163 score ( $r=-0.012, p=0.909$ ) といずれも有意な相関を示さなかった (図 10)。

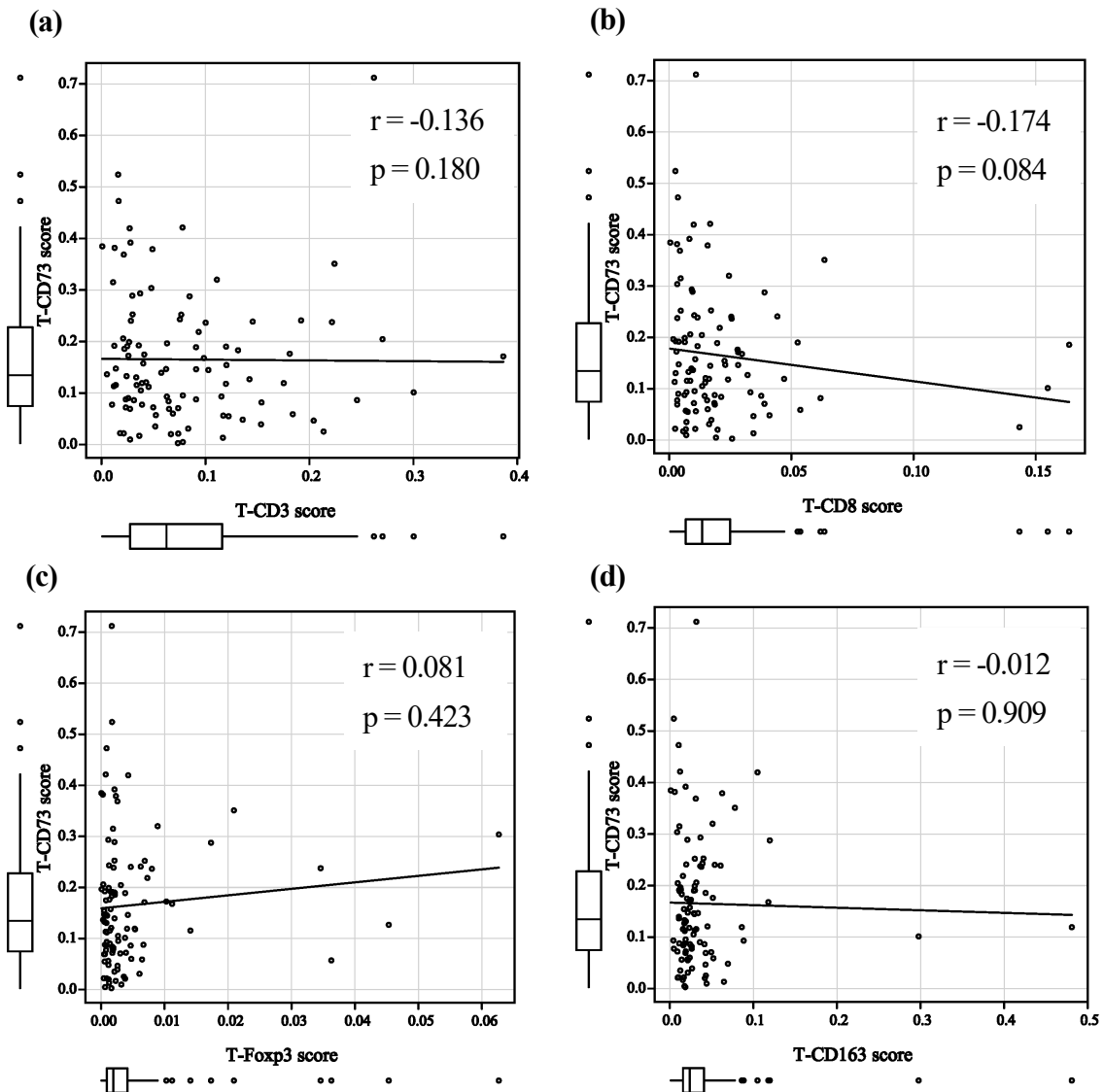


図 10 T-CD73score と腫瘍内免疫細胞サブセット密度との相関

(a) T-CD73 と T-CD3 (b) T-CD73 と T-CD8 (c) T-CD73 と T-Foxp3 (d) T-CD73 と T-CD163 score の相関を Spearman の順位相関係数を用いて評価したがいずれも統計学的に有意差を持つ相関は認めなかった。

一方で、T-CD73 score は S-CD3 ( $r=-0.246, p=0.014$ ) および S-CD8 score ( $r=-0.266,$

$p = 0.008$ ) と有意な負の相関を示した. S-Foxp3 ( $r = -0.081$ ,  $p = 0.421$ ) および S-CD163 score ( $r = -0.034$ ,  $p = 0.734$ ) とは有意な関連を認めなかった (図 11).

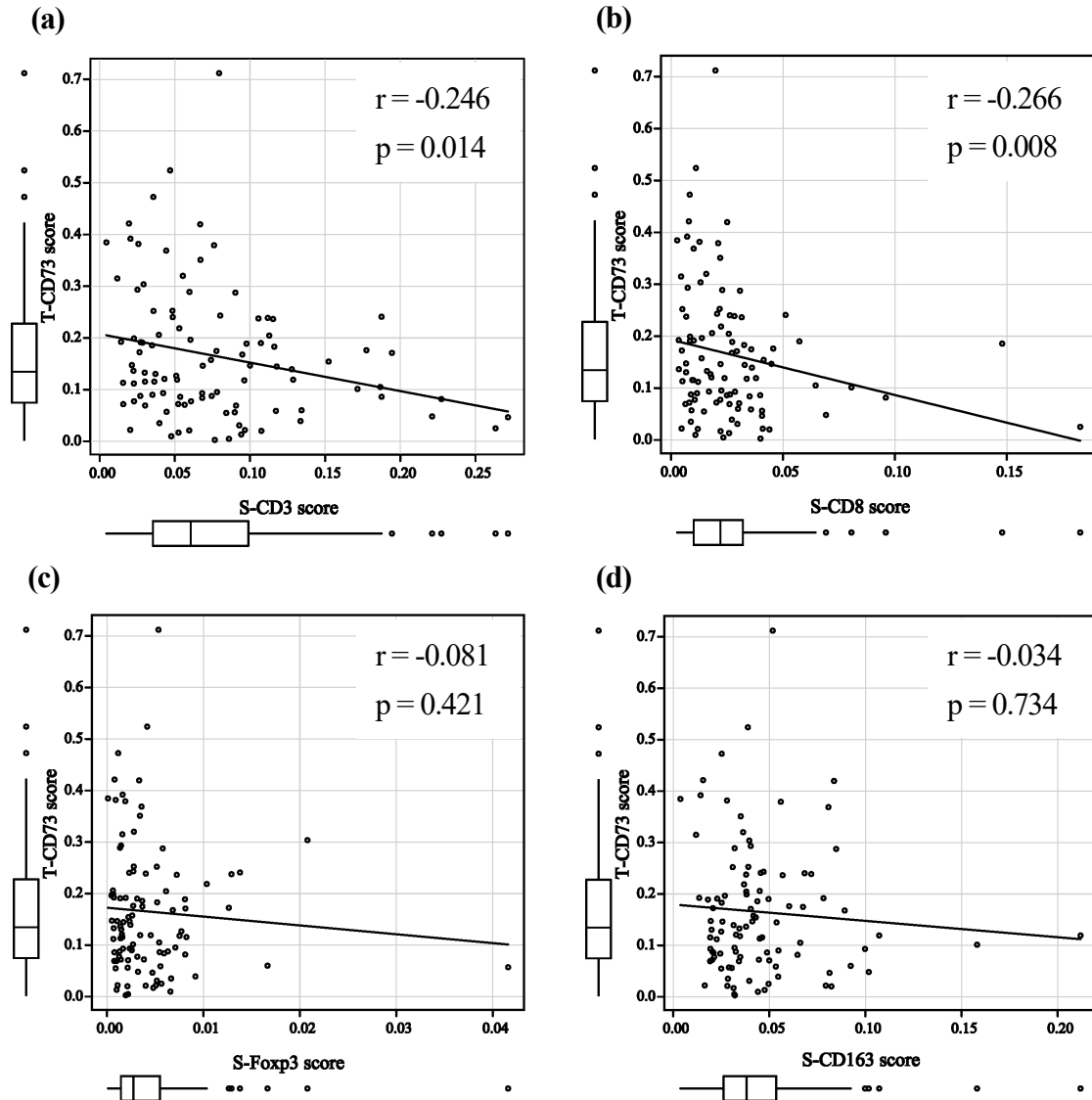


図 11 T-CD73score と間質内免疫細胞サブセット密度との相関

(a) T-CD73 と S-CD3 (b) T-CD73 と S-CD8 (c) T-CD73 と S-Foxp3 (d) T-CD73 と S-CD163 score の相関を Spearman の順位相関係数を用いて評価した. 腫瘍内 CD73 発現と間質内 CD3 陽性細胞 (成熟 T 細胞), CD8 陽性細胞 (CTL) の密度と弱い負の相関を認めた.

S-CD73 score は, T-CD3 ( $r = -0.051$ ,  $p = 0.620$ ), T-CD8 ( $r = 0.012$ ,  $p = 0.909$ ), T-Foxp3 ( $r = 0.138$ ,  $p = 0.171$ ), T-CD163 score ( $r = 0.085$ ,  $p = 0.399$ ) といずれも有意な相関を示さなかった (図 12).

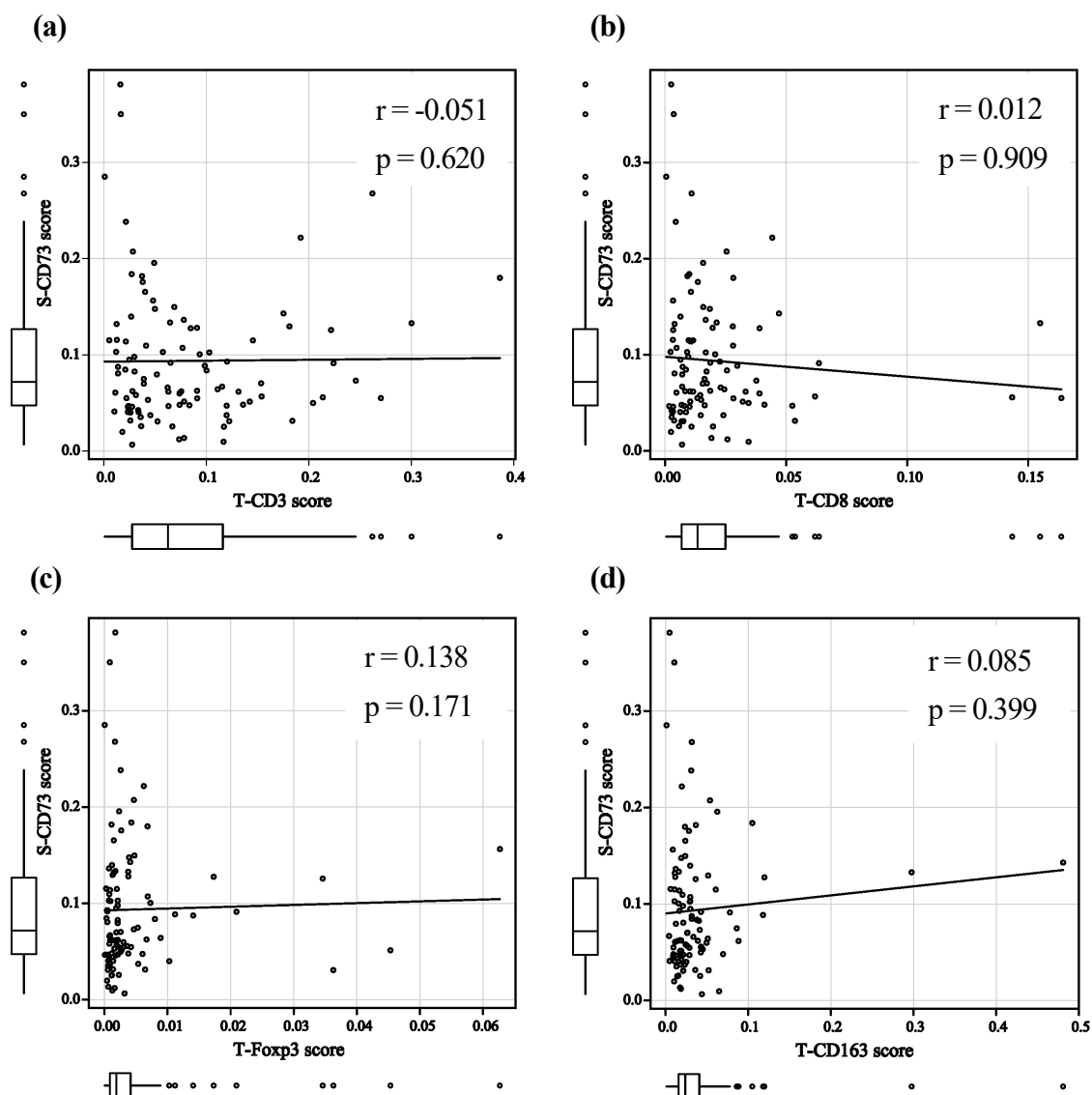


図 12 S-CD73score と腫瘍内免疫細胞サブセット密度との相関

(a) S-CD73 と T-CD3 (b) S-CD73 と T-CD8 (c) S-CD73 と T-Foxp3 (d) S-CD73 と T-CD163 score の相関を Spearman の順位相関係数を用いて評価したがいずれも統計学的に有意差を持つ相関は認めなかった。

また、S-CD73 と S-CD3 ( $r=0.067, p=0.508$ ), S-CD8 ( $r=0.016, p=0.873$ ), S-Foxp3 ( $r=0.141, p=0.162$ ) との間にも有意な関連は認められなかったが、S-CD73 と S-CD163 score との間には弱い正の相関が認められた ( $r=0.317, p=0.001$ ) (図 13)

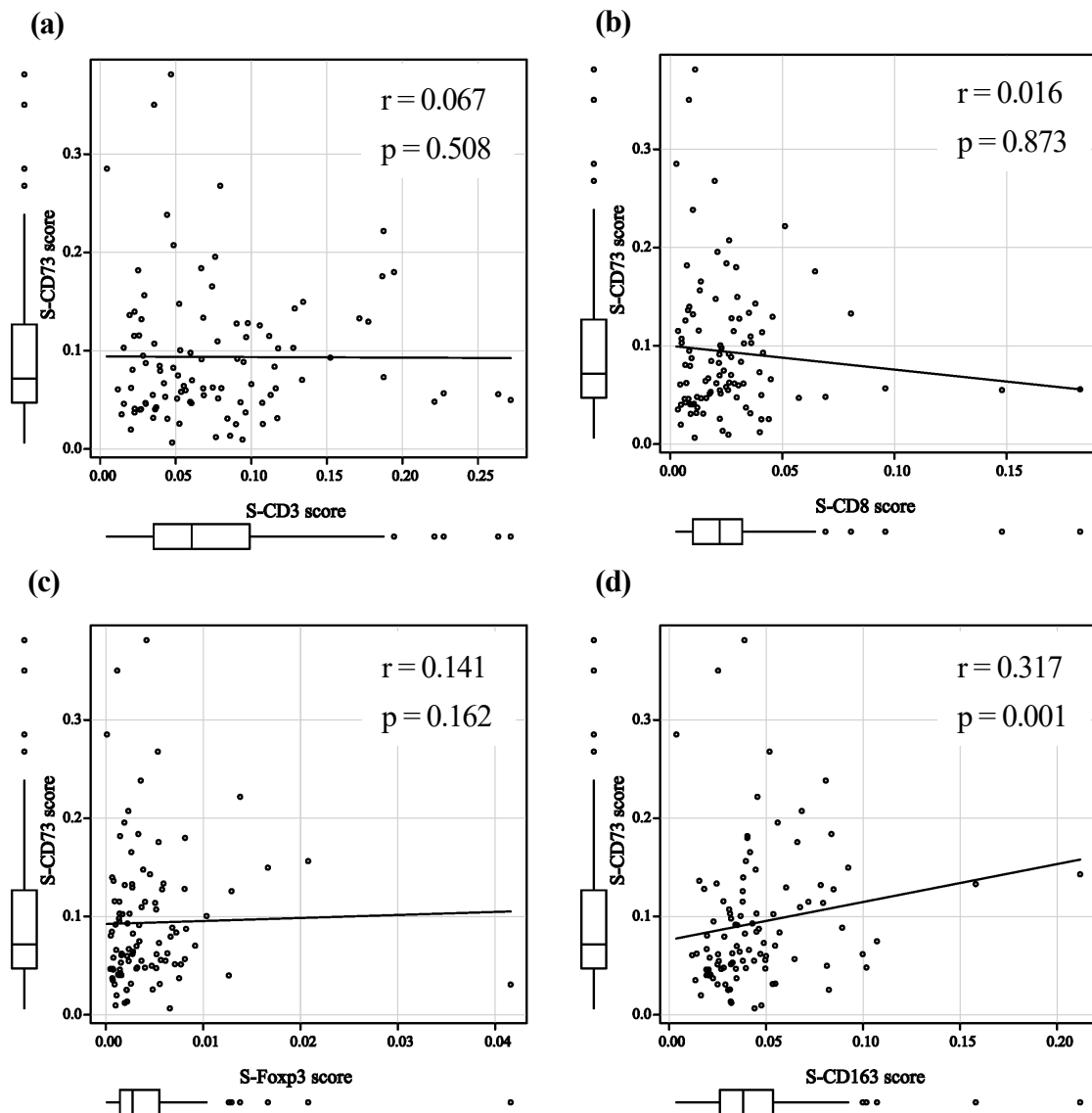


図 13 S-CD73score と間質内免疫細胞サブセット密度との相関

(a) S-CD73 と S-CD3 (b) S-CD73 と S-CD8 (c) S-CD73 と S-Foxp3 (d) S-CD73 と S-CD163 score の相関を Spearman の順位相関係数を用いて評価し、間質内 CD73 発現は間質内 CD163 陽性細胞 (M2 マクロファージ) 密度と弱い正の相関を認めた。

## 考察

本研究では、胆道癌（BTC）における腫瘍部および間質部の CD73 発現と腫瘍微小環境（TME）における免疫学的特徴，ならびに臨床転帰との関連を検討し，AI を用いた解析により，TME における腫瘍内の CD73 高発現が，腫瘍内部ではなく間質内のリンパ球を介した免疫抑制を通じて予後不良をもたらすことを明らかにした。

腫瘍細胞における CD73 の免疫組織化学的評価には，これまで H-score 法 (Dottermusch et al, 2019) が臨床現場で広く用いられているが，再現性および客観性には限界がある。DeepPathFinder™は，腫瘍領域全体を認識し，一貫性のある統一された基準に基づいて IHC 陽性領域を算出することでこれらの課題を克服し，本手法により一貫性・再現性・客観性を担保した免疫組織化学的評価が可能となった。さらに CD3, CD8, Foxp3, CD163 などの免疫関連マーカーを同時に評価することが可能となり，腫瘍微小環境における免疫細胞集団を包括的に把握することで腫瘍免疫に対する理解を一層深めることが可能となった。

本研究では DeepPathFinder™ を用い，腫瘍および間質内の CD73 の発現，TIL 密度，さらに免疫細胞の分布と密度を解析し，TIL の空間的分布を明確に捉えることが可能となり，解析の結果，腫瘍領域における CD73 発現の増加（T-CD73 score 高値）は予後不良と関連し，間質 TIL 密度の高さ（S-TIL score 高値）は良好な予後と関連することが示された。これらの結果は他癌種の先行研究と整合する傾向を示しており，DeepPathFinder™を用いた解析の妥当性を裏付けるものであったと考える。

胆道癌において CD73 発現と予後との関連を検討した報告のほとんどが肝内胆管癌に限られていたが，本研究では肝内胆管癌のみではなく胆道癌全体において腫瘍細胞の CD73 高発現が予後不良因子であることが明らかとなった。

また，BTC における TIL の予後的意義については，これまで一貫した結果が得られていない。肝内胆管癌（ICC）のコホート研究では，間質 TIL 密度の高さが無再発生存期間および全生存期間の延長と関連する一方，腫瘍内 TIL は一貫した予後因子ではないと報告されている (Goeppert et al, 2013)。一般的に腫瘍内部の TILs は非常に少数かつ空間的なばらつきが大きいため，H&E 染色標本による評価の再現性が低く，また腫瘍内 TILs は一般に間質 TILs の増減傾向と並行しており，追加的な情報は限られることから，現在では間質 TIL の評価がより安定した予後指標として推奨されている (Salgado et al, 2015)。実際に遠位胆管癌では間質内 TIL 密度の高さが良好な生存と関連していた (Jun et al, 2024)。

本研究では，DeepPathFinder™を用いることで腫瘍領域内においても H&E 染色スライドを用いて TILs の検出・測定が可能だが，T-TIL score は S-TIL score と比較し非常に低値であり，腫瘍細胞の重なり等の理由から一部の腫瘍内 TILs が検出されてい

い可能性は考えられる。本研究で測定された T-TIL score は予後との関連を示さなかった一方、高い S-TIL score が有意に良好な生存と関連し、これらの結果は、間質内 TIL の局在が胆道癌における有効な抗腫瘍免疫の指標であることを支持している。

加えて、BTC に関する複数の研究では、間質 TIL 内の特定の免疫細胞サブセットに焦点が当てられている。ある研究では癌細胞周囲の CD8<sup>+</sup> T 細胞数またはその密度が高いほど OS および DFS が延長し、Foxp3<sup>+</sup> T 細胞の浸潤増加は OS 短縮と関連していた (Liu et al, 2022)。

本研究の相関解析でも、腫瘍内 CD73 発現が間質内の CD3<sup>+</sup> および CD8<sup>+</sup> T 細胞密度と負の相関を示し、間質における CTL 浸潤の選択的抑制を示唆する結果が得られた。一方で、Foxp3<sup>+</sup> T 細胞および CD163<sup>+</sup> M2 マクロファージとの有意な関連は認められなかった。TIL はその局在・密度・機能的性質によって予後および治療反応性を規定する重要な指標とされており (Fridman et al, 2012)、本研究の知見から、特に CTL を含む間質内の TIL 密度の低下が腫瘍免疫の抑制において中心的な役割を担っていることが示唆された。今回 T リンパ球の評価は CD3, CD8, Foxp3 の 3 種類を行ったが、本研究で CD8 score, Foxp3 score は CD3 score と比較しどちらも低値であり、CD3 陽性細胞の多くを占める CD4 陽性細胞についても CD73 発現および予後との関連を評価することが重要である。

また、間質内における CD73 の発現は TIL の一部や線維芽細胞、血管内皮細胞にみられたが、本研究においては S-CD73 score は予後との相関は認めなかった。複数の細胞で CD73 の発現を認める中、大腸癌では線維芽細胞が CD73 を高発現する細胞であり、線維芽細胞が多く存在する大腸癌組織で CD73 発現が高く、かつ予後の悪化を呈するという報告もあり (Yu et al, 2020)、今後間質内の線維芽細胞をはじめとした各細胞における CD73 発現と予後および腫瘍微小環境への影響を解析する必要がある。

これまでに、胆道癌において CD73 発現と間質内 TIL の相関や予後との関連を総合的に検討した報告はない。本研究では DeepPathFinder™ を用いることで TME 内の腫瘍領域と間質領域を明瞭に区別し、それぞれの領域における CD73 発現、TIL 密度および免疫細胞の発現を高精度に定量化することができた。これにより腫瘍内の CD73 発現が間質内の TIL 密度と負の相関を示すことを初めて明らかにし、腫瘍内 CD73 の発現上昇が間質内のリンパ球浸潤を抑制することで予後悪化につながる可能性を示した。

TME は低酸素状態にあり、その条件下では CD73 活性が亢進し、間質中のアデノシン濃度が上昇し、酸素濃度の低下は T 細胞増殖の抑制を促進し、T 細胞依存性の抗腫瘍免疫を弱めて腫瘍増殖を助長することが報告されている (Doedens et al, 2010)。本研究の結果から、腫瘍微小環境における腫瘍細胞の CD73 活性上昇が、間質中のアデノシン濃度を増加させ、間質内の CTL をはじめとする TIL 密度を減少させることで免疫逃避を促進し、予後不良に結びつく可能性が示された。

本研究にはいくつかの限界がある。第一に、本研究は単施設で実施された後ろ向き研究であり、大規模な前向きコホートによる検証が必要である。第二に、胆道癌の部位や病期ごとの解析は、各コホートの症例数が限られていたため十分に行うことができなかった。第三に、CD73 発現やリンパ球浸潤と化学療法の治療効果（抗 PD-1/PD-L1 抗体使用の有無を含む）との関連については、後ろ向き研究の性質上、治療法を統一できず検討できなかった。第四に、TIL score は H&E 染色スライドを用いた評価であり、リンパ球1つ1つを同定し合計面積として算出されているが、各免疫細胞の score は腫瘍/間質における免疫染色された部分全体の面積を算出しているため、個々のリンパ球を認識するものとは異なり、免疫染色された領域の方が概略的に識別され、広くなってしまうことがあげられ、TIL score と各免疫細胞の score に乖離ができた。最後に、切除不能胆道癌で生検検体を用いた評価ができていない。生検検体は組織量が僅少であり腫瘍微小環境の詳細な解析は困難であり、また同一腫瘍内でも CD73 発現に heterogeneity を認められることから、採取された生検組織が腫瘍における CD73 活性を必ずしも反映していない可能性があげられる。生検組織における腫瘍細胞の CD73 発現と予後の関連を評価することは可能だが、同一腫瘍の生検検体を複数採取し評価する、といった工夫が必要になる。

総じて、本研究は腫瘍内の CD73 高発現が間質内の CTL をはじめとした TIL の浸潤を低下させることで免疫逃避を促進し、胆道癌患者の予後不良を引き起こすという結果を示した。治療的観点からは、CD73-アデノシン経路を標的とする化学療法は間質内 TIL 密度を保つことで免疫逃避を阻害し抗腫瘍効果を呈する可能性があり、BTC に対する治療選択の幅を広げる可能性がある。

## 結論

本研究で得られた新規知見は以下の通りである。

- ・胆道癌において腫瘍細胞の CD73 高発現が予後不良因子となる。
- ・胆道癌において間質内に浸潤するリンパ球の密度低下は予後不良因子となる。
- ・腫瘍微小環境において腫瘍細胞の CD73 高発現は間質内に浸潤するリンパ球密度、および CTL の密度を低下させる。

今後の課題としては、本研究における知見の検証のため、多施設、および多数例での大規模前向き研究を行うことが必要となる。また AI のアルゴリズムの修正を通し H&E 染色スライドで認識された TILs と免疫染色領域が重なる部分の面積を算出するといった検討が必要となる。腫瘍微小環境の更なる検討では、空間トランスクリプトーム解析を用いて、本研究で測定した免疫細胞のみならず CD4 陽性細胞をはじめとする免疫細胞の評価を行い、CD73 発現が腫瘍微小環境および存在する免疫細胞に与える影響をより詳細に解析する。切除不能胆道癌において、生検検体中の CD73 発現量と予後との相関を確認する。最後に実臨床において、CD73 発現や浸潤リンパ球と免疫チェックポイント阻害薬を中心とした化学療法に対する治療効果との関連を検討することも必要である。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導・ご助言をいただきました北海道大学病院消化器内科助教の川久保和道先生、講師の栗谷将城先生、北海道大学大学院医学研究院内科学分野消化器内科学教室の坂本直哉教授に深く感謝申し上げます。

研究の具体的な手技等のご指導をいただきました北海道大学病院先端診断技術開発センターのスタッフの皆様、特任助教の四宮義貴先生、特任講師の畑中佳奈子先生、特任准教授の畑中豊先生に深く感謝申し上げます。

DeepPathFinder™による解析を施行していただいた株式会社 biomy の小林拓馬先生、小西哲平先生にも感謝申し上げます。

手術検体の提供を快く許諾くださった北海道大学大学院医学院・医学研究院消化器外科学教室Ⅱ助教の中西喜嗣先生、教授の平野聡先生、北海道大学保健科学研究院基盤看護学分野教授の野路武寛先生に深く感謝申し上げます。

病理検体の提供および病理診断情報を提供下さった北海道大学病院病理部/病理診断科教授の田中伸哉先生に深く感謝申し上げます。

最後に、日々の診療の中、様々な面でご援助いただきました北海道大学病院消化器内科胆膵グループの先生方に心より感謝申し上げます。

## 利益相反

本研究は株式会社 biomy により DeepPathFinder™を用いた病理画像の解析を行った。本研究のデザイン，分析，およびデータの解釈について，資金提供者は関与していない。

## 引用文献

Asano H, Hatanaka KC, Kobayashi T, et al. AI-powered quantification of tumor-infiltrating lymphocytes from H&E stained images in ovarian cancer and its association with PARP inhibitor therapy outcomes. *J Clin Oncol*. 2025; 43: 5575.

Cao L, Bridle KR, Shrestha R, et al. CD73 and PD-L1 as potential therapeutic targets in gallbladder cancer. *Int J Mol Sci*. 2022; 23: 1565.

Cao L, Che X, Qiu X, et al. M2 macrophage infiltration into tumor islets leads to poor prognosis in non-small-cell lung cancer. *Cancer Manag Res*. 2019; 11: 6125–38. doi:10.2147/CMAR.S199832.

Colgan SP, Eltzschig HK, Eckle T, et al. Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinergic Signal*. 2006; 2(2): 351–360.

Doedens AL, Stockmann C, Rubinstein MP, et al. Macrophage expression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  suppresses T-cell function and promotes tumor progression. *Cancer Res*. 2010; 70: 7465–75. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-1439.

Dottermusch M, Krüger S, Behrens HM, et al. Expression of the potential therapeutic target claudin-18.2 is frequently decreased in gastric cancer: results from a large Caucasian cohort study. *Virchows Arch*. 2019; 475(5): 563–571.

Fridman WH, Pagès F, Fridman CS, et al. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer*. 2012; 12(4): 298–306.

Gao ZH, Li CX, Liu M, et al. Predictive and prognostic role of tumour-infiltrating lymphocytes in breast cancer patients with different molecular subtypes: a meta-analysis. *BMC Cancer*. 2020; 20: 1150.

Gao ZW, Wang HP, Lin F, et al. CD73 promotes proliferation and migration of human cervical cancer cells independent of its enzyme activity. *BMC Cancer*. 2017; 17(1): 135.

Goeppert B, Frauenschuh L, Zucknick M, et al. Prognostic impact of tumour-infiltrating immune

cells on biliary tract cancer. *Br J Cancer*. 2013; 109(10): 2665–2673.

Haskó G, Linden J, Cronstein B, et al. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2008; 7(9): 759–770.

Jiang T, Xiaofeng X, Meng Qiao, et al. Comprehensive evaluation of NT5E/CD73 expression and its prognostic significance in distinct types of cancers. *BMC Cancer*. 2018; 18: 267. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4073-7>

Jun SY, An S, Hong SM, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in distal extrahepatic bile duct carcinoma. *ESMO Open*. 2024; 9(11): 103969. doi:10.1016/j.esmoop.2024.103969.

Kanda Y. Investigation of the freely available easy-to-use software “EZR” for medical statistics. *Bone Marrow Transplant*. 2013; 48: 452–8. doi:10.1038/bmt.2012.244.

Kobayashi T, Tomioka N, Hatanaka KC, et al. AI-based quantification of TILs using hematoxylin and eosin and immunohistochemistry-stained slides in triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol*. 2024; 42: e13608.

Komura D, Onoyama T, Shinbo K, et al. Restaining-based annotation for cancer histology segmentation to overcome annotation-related limitations among pathologists. *Patterns (N Y)*. 2023; 4(2): 100688.

Liu D, Heij LR, Czigany Z, et al. The role of tumor infiltrating lymphocytes in cholangiocarcinoma. *J Exp Clin Cancer Res*. 2022; 41: 127.

Nakachi K, Ikeda M, Konishi M, et al. Adjuvant S-1 compared with observation in resected biliary tract cancer (JCOG1202, ASCOT): a multicentre, open-label, randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet*. 2023 Jan 21; 401(10372): 195–203.

National Cancer Center Japan. Cancer statistics in Japan 2022 [Internet]. Tokyo: National Cancer Center Japan [cited 2022 Dec 1]. Available from: [https://ganjoho.jp/public/qa\\_links/report/statistics/2022\\_en.html](https://ganjoho.jp/public/qa_links/report/statistics/2022_en.html)

Oh D-Y, He AR, Qin S, et al. Durvalumab plus gemcitabine and cisplatin in advanced biliary tract cancer. *NEJM Evidence*. 2022; 1(8): EVIDoa2200015.

Pagès F, Mlecnik B, Marliot F, et al. International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. *Lancet*. 2018; 391(10135): 2128–39.

Pan Y, Zhou H, Sun Z, et al. Regulatory T cells in solid tumor immunotherapy: effect, mechanism and clinical application. *Cell Death Dis*. 2025; 16: 277.

Sakai D, Kanai M, Kobayashi S, et al. Randomized phase III study of gemcitabine, cisplatin plus S-1 (GCS) versus gemcitabine, cisplatin (GC) for advanced biliary tract cancer (KHBO1401-MITSUBA) [ESMO abstract]. *Ann Oncol*. 2018; 29(Suppl 8): VIII205.

Samaneh A, Jamshid H. Adenosine Blockage in Tumor Microenvironment and Improvement of Cancer Immunotherapy. *Immune Netw*. 2019; 19(4): e23.

Salgado R, Denkert C, Demaria S, et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol*. 2015; 26(2): 259–271.

Sciarra A, Monteiro I, Ménétrier-Caux C, et al. CD73 expression in normal and pathological human hepatobiliopancreatic tissues. *Cancer Immunol Immunother*. 2019; 68: 467–478.

Tao X, Keyu L, Nan N, et al. Immune cell atlas of cholangiocarcinomas reveals distinct tumor microenvironments and associated prognoses. *J Hematol Oncol*. 2022; 15(1): 37

Turcotte M, Spring K, Pommey S, et al. CD73 is associated with poor prognosis in high-grade serous ovarian cancer. *Cancer Res*. 2015; 75(21): 4494–4503.

Valle JW, Kelley R, Furuse J, et al. 78TiP KEYNOTE-966 trial in progress: Pembrolizumab plus gemcitabine and cisplatin for advanced biliary tract cancer [ESMO abstract]. *Ann Oncol*. 2020; 31: S270–1.

Wang H, Lee S, Nigro CL, et al. NT5E (CD73) is epigenetically regulated in malignant melanoma

and associated with metastatic site specificity. *Br J Cancer*. 2012; 106(8): 1446–1452.

Wang L, Fan J, Thompson LF, et al. CD73 has distinct roles in nonhematopoietic and hematopoietic cells to promote tumor growth in mice. *J Clin Investig*. 2011; 121(6): 2371–2382.

Wang R, Zhang Y, Lin X, et al. Prognostic value of CD73-adenosinergic pathway in solid tumor: a meta-analysis and systematic review. *Oncotarget*. 2017; 8(34): 57327–57336.

Wu XR, He XS, Chen YF, et al. High expression of CD73 as a poor prognostic biomarker in human colorectal cancer. *J Surg Oncol*. 2012; 106(2): 130–137.

Xu S, Shao QQ, Sun JT, et al. Synergy between the ectoenzymes CD39 and CD73 contributes to adenosinergic immunosuppression in human malignant gliomas. *Neuro Oncol*. 2013; 15(9): 1160–1172.

Xu YP, Zhou YQ, Zhao YJ, et al. High level of CD73 predicts poor prognosis of intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Cancer*. 2021; 12(15): 4655–4660.

Yu M, Guo G, Huang L, et al. CD73 on cancer-associated fibroblasts enhanced by the A2B-mediated feedforward circuit enforces an immune checkpoint. *Nat Commun*. 2020; 11(1): 515

Zhang B, Song B, Wang X, et al. The expression and clinical significance of CD73 molecule in human rectal adenocarcinoma. *Tumour Biol*. 2015; 36(7): 5459–5466.

Zhi X, Wang Y, Yu J, et al. Potential prognostic biomarker CD73 regulates epidermal growth factor receptor expression in human breast cancer. *IUBMB Life*. 2012; 64(11): 911–920.

Zimmermann H, Zebisch M, Strater N. Cellular function and molecular structure of ectonucleotidases. *Purinergic Signal*. 2012; 8(3): 437–502.